

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 197 27 962 A 1

⑯ Aktenzeichen: 197 27 962.7
⑯ Anmeldetag: 2. 7. 97
⑯ Offenlegungstag: 14. 1. 99

⑯ Int. Cl. 6:
C 12 N 5/10
C 07 K 14/435
C 12 N 15/85
C 12 Q 1/18
C 12 Q 1/02
A 01 K 67/027

⑯ Anmelder:
Hescheler, Jürgen, Prof. Dr. (Univ.), 50968 Köln, DE
⑯ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑯ Erfinder:
gleich Anmelder
⑯ Entgegenhaltungen:
Development 124, S.1133-1137, 1997;
Blood 88 (10 Suppl. 1 Part 1-2) 1996, 295B;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Fluoreszierende Proteine als zelltypspezifische Reporter
⑯ Die Erfindung betrifft embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert sind, das eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor umfaßt; ein Verfahren zur Herstellung dieser ES-Zellen; eine Zellkultur erhältlich durch Kultivieren der ES-Zellen; ein Verfahren zur toxikologischen Prüfung von Substanzen unter Verwendung dieser Zellkulturen; ein Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-menschlicher Säuger unter Verwendung der ES-Zellen; einen durch dieses Verfahren erhältlichen transgenen nicht-menschlichen Säuger und ein Verfahren zur Untersuchung von Zellentwicklungsstufen unter Verwendung von Zellen eines solchen nicht-menschlichen Säugers.

DE 197 27 962 A 1

DE 197 27 962 A 1

AZ

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteinen als zelltypspezifische Reporter. Im einzelnen betrifft die Erfindung embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert sind, das eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor umfaßt: ein Verfahren zur Herstellung dieser ES-Zellen; eine Zellkultur erhältlich durch Kultivieren der ES-Zellen; ein Verfahren zur toxikologischen Prüfung von Substanzen unter Verwendung dieser Zellkulturen; ein Verfahren zur Erzeugung transgener nichtmenschlicher Säuger unter Verwendung der ES-Zellen; einen durch dieses Verfahren erhältlichen transgenen nicht-menschlichen Säuger und ein Verfahren zur Untersuchung von Zellentwicklungsstufen unter Verwendung von Zellen eines solchen nicht-menschlichen Säugers.

Embryonale Stammzellen (ES) sind Grundlage sowohl für die Erzeugung transgener Tiermodelle, als auch für den Einsatz in *in vitro* Zellkultursystem. Bis her wurden die sich aus ES-Zellen differenzierenden Zelltypen dadurch identifiziert, daß sie durch Antikörperfärbung bzw. durch *in situ*-Hybridisierung mit Antisense-Oligonukleotiden gekennzeichnet wurden. Dazu mußten allerdings die Zellen zuvor fixiert werden.

Alle bisherigen Verfahren eignen sich nicht für anschließende funktionelle Untersuchungen mit den von ES-Zellen differenzierten, unterschiedlichen Zelltypen. Die bisher einzige Methode, um funktionelle Untersuchungen an ES-Zell-abgeleiteten Zellderivaten *in vivo* durchzuführen, bestand in der morphologischen Identifizierung. Dies gelang, wenn auch nur sehr unbefriedigend, bei den Herz- und Skelettmuskelzellen; da diese sich durch Kontraktionen auszeichneten. Schon bei den nicht kontrahierenden Ventrikelzellen war die Erkennung für funktionelle Untersuchungen schwierig. So wird im Maltsev et al., 1994, Circ Res., 75, 233-244 und DD-299439 AS ein Modell beschrieben, in dem die Differenzierung von Herzzellen (Kardiomyozyten) ausgehend von einer sehr frühen Entwicklungsstufe bis zur spezialisierten Schrittmacher-, ventrikulären, oder atrialen Herzzelle *in vitro* stattfindet (Maltsev et al., 1994, Circ Res., 75, 233-244). Zu diesem Zweck werden totipotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Zelllinie D3 unter den folgenden Zellkulturbedingungen in Kardiomyozyten differenzieren: Die Zellen werden 2 Tage in einem hängenden Tropfen angesetzt, dann 5 Tage in Suspension gehalten und anschließend ausplatiert (Maltsev et al., 1994, Circ Res., 75, 233-244). Innerhalb von 1-2 Tagen nach der Platierung bilden sich spontan schlängende Areale innerhalb dieser "Embryoid Bodies" (EB's). Aus diesen Arealen können mit Hilfe enzymatischer Verdauung (Kollagenase) einzelne Kardiomyozyten dissoziiert werden, die funktionellen, molekulärbiologischen und morphologischen (Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie) Untersuchungstechniken während den verschiedenen Differenzierungsstadien zugänglich sind. Neben den Kardiomyozyten befinden sich in den so erzeugten EB's unter anderem auch neuronale Zellen, Gliazellen, hämatopoietische Zellen, Endothelzellen (frühe Kapillare), glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen.

Darüber hinaus sind in der letzten Zeit bioluminiscente Proteine wie Green Fluorescent Protein (nachfolgend GFP) beschrieben worden (Prasher et al., Gene, Vol. 111 229-233 (1992), die als Marker für Genexpression vorgeschlagen werden (Chalfie et al., Science, Vol. 263, 802-805 (1994)).

So ist in der WO-A-95107463 und WO-A-96/27675 das Transformieren von Zellen mit GFP offenbart. Die Transformation von Säugerzellen, insbesondere deren ES-Zellen mit einer für GFP codierenden DNA-Sequenz ist jedoch weiter in dieser noch in einer anderen Druckschrift beschrieben worden.

Herz-Kreislauferkrankungen gehören immer noch zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Nur durch intensive Grundlagenforschung auf diesem Gebiet können die pathophysiologischen Ursachen erkannt und neue Therapieansätze gefunden bzw. toxikologische Veränderungen beschrieben werden. Für die Untersuchung zur Pathogenese von Herz-Kreislauf Erkrankungen und zum Testen neuer pharmakologischer und toxikologischer Substanzen werden Modelle benötigt, die einerseits auf den Menschen übertragbar sind, andererseits aber die aufwendigen und kostenintensiven Tierversuchsmodelle ersetzen können. Im Jahr 1991 wurden noch über 2 Millionen Tiere allein in den alten Bundesländern bei Tierversuchen eingesetzt.

Ein in letzter Zeit immer wichtigerer Ansatzpunkt der pharmakologisch/toxikologischen Forschung ist die Herz-differenzierung. Aus der stereotypisch ablaufenden Herzzellentwicklung können Rückschlüsse auf pathologische und toxikologische Veränderungen von Kardiomyozyten gezogen werden. So ist z. B. bekannt, daß bei der kardialen Hypertrophie (Yamazaki et al., J. Mol. Cell Cardiol. 27 (1): 133-140 (1995)) und Herzinsuffizienz (Johnson et al., Biochem. Pharmacol. 45 (12): 2365-2372 (1993)) der Rezeptorstatus und die intrazellulären Signalkaskaden gestört sind. Diese pathologisch veränderten Kardiomyozyten ähneln teilweise wieder Herzzellen früher Differenzierungsstadien.

Die zur Aufklärung der Eigenschaften von Herzzellen früher Differenzierungsstadien notwendigen Untersuchungen können am Tier jedoch technisch nur schwer und, falls überhaupt, in sehr aufwendigen Studien durchgeführt werden: Am 12.-13. Tag ist es frühestens möglich, Kardiomyozyten aus einem Mäuseembryo zu präparieren, diese Zellen entsprechen jedoch nicht mehr einer frühen kardialen Differenzierungsstufe. Eine detaillierte Analyse der Rezeptorexpression während verschiedener Differenzierungsstadien erfordert einen sehr hohen Aufwand an Tiermaterial und ist – wie vorstehend ausgeführt – technisch nur schwer durchführbar. Ebenso ist die Beobachtung der Entwicklung einer relativ undifferenzierten Herzzelle über mehrere Tage bis Wochen hinweg am Tiermodell nicht möglich. Um den Einsatz neuer Therapeutika, z. B. inotroper Substanzen oder Antiarrhythmika bzw. toxischer Stoffe, z. B. Schwermetalle oder Retinoide, auszutesten, muß im Tierversuch ein Wochenlanges, invasives Monitoring an Tieren z. B. Schweißen durchgeführt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand nun darin, ein Zellkulturverfahren bereitzustellen, das eine einfache Charakterisierung der lebenden Zellen ermöglicht und funktionelle Untersuchungen zuläßt und nicht wie die bisherigen Verfahren auf Reportergenen wie z. B. Lac-Z (Niwa et al., 1991, Gene 108, 193-199; Wobus et al., 1996, J. Cell Mol. Cardiol.: Metzger et al., 1996 Circ. Res., 78, 547-552) beruht, deren Expression nur nach Zellfixierung und unter Zuhilfenahme eines spezifischen Substrates nachgewiesen werden kann.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß ES-Zellen mit einem DNA-Konstrukt, in dem ein für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierendes Gen mit einem zell- und entwicklungsabhängigen Promotor gekoppelt ist, mittels Elektroporation stabil transfiziert werden können. Dieses Konstrukt wird dabei in die naive DNA integriert. Nach spezifischer Aktivierung intrazellulärer Signale wird

der Promotor aktiviert und das fluoreszierende Protein exprimiert. Somit könnten ES-Zellen, die zu einem gewissen Zeitpunkt der Differenzierung einen zellspezifischen Transkriptionsfaktor aktivieren, anhand der Fluoreszenz-Emission unter Fluoreszenzanregung erkannt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nichtmenschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend

- eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und
- einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor

stabil transfiziert sind.

Bevorzugt stammen die ES-Zellen von Nagern, insbesondere von Mäusen. Besonders bevorzugte ES-Zellen sind dabei D3-Zellen (Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27 (1985)), R1-Zellen (Nagy et al., PNAS (1995)), E14-Zellen (Handyside et al., Roux Arch. Develop. Biol. 198, 48 (1989)), CCE-Zellen (Bradley et al., Nature 309, 255 (1985)) und P19-Zellen (Mummery et al., Dev. Biol. 109, 402 (1985)).

Als "nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein" können gemäß der vorliegenden Erfindung das Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea Victoria* (beschrieben in WO-A-95/07463, WO-A-96/27675 und WO-A-95121 191) und dessen Derivate "Blue GFP" (Heini et al., Curr. Biol. 6 (2): 178-182 (1996)) und Redshift GFP" (Muldoon et al.; Biotechniques 22 (1): 162-167 (1997)) verwendet werden. Bevorzugt ist dabei das grün fluoreszierende GFP, insbesondere die in dem hinterlegten Stamm DSM 11633 befindliche GFP-Mutante.

Unter den Begriff "zell- und/oder entwicklungsabhängiger Promotor" ist gemäß der vorliegenden Erfindung ein Promotor zu verstehen, der nur in gewissen Zelltypen und/oder nur in gewissen Zellentwicklungsstadien – sowohl in Zellkulturen (Embryoid Bodies) als auch in transgenen nicht-menschlichen Säugern, die von den erfundungsgemäßen ES-Zellen abstammen – seine Promotoraktivität entfaltet. Daneben kann aber auch jeder andere bekannte zellspezifische Promotor für z. B. Nervenzellen, Herzzellen, neuronale Zellen, Gliazellen, hämatopoiese Zellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Promotor ein für Herzzellen spezifischer Promotor. Insbesondere sind die folgenden Promotoren zu nennen: SMHC Minimal Promotor (spezifisch für Glattmuskelzellen, Kallmeier et al., J. Biol. Chem. 270 (52): 30949-30957 (1995)); Nkx-2.5 (spezifisch für sehr frühe Kardiomyozyten, Lints et al., Development, 119 (2): 419-431 (1993)); Human- α -Actin (spezifisch für Herzgewebe, Sartorelli et al., Genes Dev. 4 (10): 1811-1822 (1990)), MLC-2V (spezifisch für Herzkammern, O'Brien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (11): 5157-5161 (1993) und WO-A-96/16163).

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das DNA-Konstrukt noch weitere funktionelle DNA-Sequenzen, insbesondere Enhancer und Selektionssequenzen auf. Solche Selektionsequenzen sind z. B. Neomycin und Hygromycin.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin, ein Verfahren zur Herstellung der erfundungsgemäßen ES-Zellen, umfassend

- Einbringen eines vorstehend definierten DNA-Konstrukt in Ausgangs-ES-Zellen nicht-menschlicher Säuger und
- Screenen nach stabil transfizierten ES-Zellen. Das

Einbringen kann dabei auf jede dem Fachmann bekannte Art und Weise erfolgen. Die Elektroporation ist jedoch bevorzugt. Das Screenen erfolgt vorzugsweise mit Hilfe der in dem DNA-Konstrukt vorhandenen Selektionssequenzen.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das vorstehend beschriebene DNA-Konstrukt. Bevorzugte Konstrukte sind dabei die in Fig. 1 und 2 abgebildeten Reporterkonstrukte 10 pCX-(β -act)GFP-Neo und pCX-(α -act)GFP-Neo (DSM 11633).

Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Zellkultur mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins erhältlich durch Kultivieren der 15 erfundungsgemäßen ES-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform liegen die Zellen als Aggregate (Embryoid Bodies) vor. Das Herstellen des Embryoid Bodies erfolgt dabei gemäß Standardverfahren wie z. B. die Methode des "hängenden Tropfens" oder Methylzellulosekultur (Wobus et al., Differentiation (1991) 48, 172-182).

Diese Zellstrukturen können in Verfahren zur toxikologischen Untersuchung von Substanzen, z. B. Retinoide, Schwermetall und Pharmaka, verwendet werden. Sie besitzen wesentliche Vorteile gegenüber allen bisher verwendeten Zellkulturmodellen:

- a) Die lebenden, unfixierten Zellen können in ihrer Differenzierung beobachtet werden, so kann z. B. das Wachstum der Herzzellen im schlagenden Areal kontinuierlich beobachtet werden.
- b) Zellen im frühen Entwicklungsstadium können elektrophysiologischen und anderen Meßmethoden zugänglich gemacht werden, da sie als fluoreszierende Zellen leicht zu erkennen sind (siehe Fig. 3). Dies bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der funktionellen Untersuchung dieser Zellen.
- c) Eine Einzelzell-Präparation bedeutet einen Verlust von Zellen. Um die geringe Zahl der noch vorhandenen Zellen sichtbar zu machen, sind die das fluoreszierende Protein exprimierenden Zellen vorteilhaft. Das Verfahren lässt sich durch die FACS-Sortierungsmethode ergänzen, wodurch homogene Zellpopulationen gewonnen werden können. Dadurch ist es auch möglich Untersuchungen (z. B. molekularbiologische) an einer größeren Population von phänotypisch differenzierten ES-Zellen vorzunehmen.
- d) Da die das fluoreszierende Protein exprimierenden ES-Zellen nach Aktivierung herzspezifischer Promotoren im EB sichtbar werden, kann das Wachstum der herzspezifischen Zellen unter pharmakologisch/toxikologischen Bedingungen in einem recht einfachen Verfahren bestimmt werden. Für routinemäßige Untersuchungen der Wirkung verschiedener Substanzen auf die Herzelldifferenzierung könnte das Areal im EB von fluoreszierendes Protein exprimierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden und somit Aussagen gemacht werden, ob diese Substanzen die Differenzierung von Herzzielen quantitativ und qualitativ beeinflussen. Für quantitativ präzisere Aussagen könnten die Zellen dissoziiert und dann der FACS-Sortierungstechnik unterzogen werden (Fig. 4).

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Erzeugung transgener nichtmenschlicher Säuger mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins, umfassend

- Injizieren von erfundungsgemäßen ES-Zellen in Bla-

siozyten von nicht-menschlichen Säugern und

- Übertragen der Blastozysten in Lehmütter, die durch dieses Verfahren erhältliche transgene nicht-menschliche Säuger sowie ein Verfahren zur Untersuchung von Entwicklungsstufen von Zellen nicht-menschlicher Säuger, umfassend die Untersuchung der entsprechenden gekennzeichneten Zellen von erfundungsgemäßen nichtmenschlichen Säugern durch fluorigmetrische Verfahren.

Im Ganztier kann durch das erfundungsgemäße Untersuchungsverfahren erstmals *in vivo* eine genaue Zelltypisierung vorgenommen werden. So sollten bereits in den frühen Organanlagen der Embryonen fluoreszierende Herzzen beobachtet werden, was eine *in vivo* Beobachtung der Herzentwicklung in der frühembyonalen Phase möglich machen würde. Auch dadurch könnten zu verschiedenen Entwicklungsstufen die Herzzen leicht identifiziert werden.

Die Erfindung wird weiterhin durch folgende Figuren und Beispiele erläutert.

Fig. 1 zeigt den in Beispiel 1 verwendeten Reportergenkonstrukt pCX-(β -act)GFP-Neo.

Fig. 2 zeigt den in Beispiel 2 verwendeten Reportergenkonstrukt pCX-(α -act)GFP-Neo (DSM 11633):

Fig. 3. Teil A: Gezeigt sind 2 junge EBs in Suspension unter transmittiertem Licht (Aa) und unter 488 nm Exzitation (Ab). Da sich in diesen frühen EBs noch keine Herzzen differenziert haben, ist keine grüne Fluoreszenz sichtbar.

Teil B: EB nach 3 Tagen Platierung (7+3 Tage) unter transmittiertem Licht (Ba), bei 488 nm Fluoreszenzexzitation (Bb) und in Kombination von transmittiertem Licht und 488 nm Fluoreszenzexzitation. In diesem EB konnte ein relativ kleines, spontan schlagendes Areal beobachtet werden. Dies entspricht dem Teil des EB mit spontanen Kontraktionen. Die EBs wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Fig. 4: Gezeigt sind die mittels FACS-Methode erstellte Verteilungshistogramme von Zellen aus EB's, die aus ES-Zellen mit pCX-(α -act)GFP-Neo gewonnen wurden. Das Konstrukt wurde mittels AatI linearisiert, so daß der CMV-IE Enhancer zerstört wurde.

- (a) ES-Zellen
- (b) nach 2 Tagen Suspension (2+2 Tage)
- (c) 5 Tage nach Platieren (7+5 Tage)

α -Achse: Intensität der GFP Fluoreszenz (FACS-Einheiten), y-Achse: gezählte Zellen

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung stabiler ES-Zelllinien, die GFP unter einem starken ubiquitären Promotor exprimieren, und Differenzierung und Eigenschaften von Kardiomyozyten, die von diesen Zellen abstammen.

a) Herstellen des GFP-Expressions-Konstrukt: Der von Dr. Okabe (University of Osaka, Japan) zur Verfügung gestellte pCX-GFP-Expressionsvektor, der eine GFP-codierende Sequenz unter einem Huhn- α -Actin-Promotor enthält (M. Ikawa, K. Kominami, Y. Yoshimura, K. Tanaka, Y. Nishimune und M. Okabe, Develop. Growth Differ. (1995) 37, 455-459), wurde wie folgt modifiziert:

Ein SalI-XbaI-Restriktionfragment, das ein Neomycin-(G418)-Resistenz-Gen von pTL2Neo enthält (von Dr. Tarakhovsky zur Verfügung gestellt), wurde durch

Ligasierung mit glatten Enden in die SalI-Stelle von pCX-GFP eingesetzt. Das resultierende Konstrukt pCX-(β -act)GFP-Neo (Fig. 1) wurde für die Elektroporation von D3-Zellen verwendet.

b) Elektroporation und Selektionsverfahren: Das pCX-(β -act)GFP-Neokonstrukt wurde mit Restriktase ScaI linearisiert (außerhalb der GFP-Expressionscassette) und für die Elektroporation der D3-Linie von ES-Zellen unter den folgenden Bedingungen verwendet: DNA: 20-40 μ g, Zellen: 7 \times 10/ml in 0.8 ml PBS-Puffer, Elektroporationsküvette BioRad 0.4 cm (Kat.-Nr. 165-2088), Elektroporationsapparatur BioRad (Gen Pulser), 240 V, 500 μ F.

15 Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension 20 min auf Eis gelegt und dann auf eine 10-cm-Platinschale mit Gewebequalität mit G418-Resistenz-Feederschicht in 10 ml DMEM-Medium mit 15% FCS (Kälberfleusserum) übertragen. Zwei Tage später wurde 300 μ g/ml Neomycin (G418, Gibeo) hinzugefügt um G418-resistente Zellen zu 20 selektieren. Das Medium mit G418 (300 μ g/ml) wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht. Nach 8 bis 10 Tagen Selektion erschienen wirkstoffresistente Kolonien, die durch Fluoreszenzmikroskopie auf GFP-Expression getestet wurden.

25 Etwa 95% der G418-resistenten Kolonien zeigen eine starke GFP-Expression (grünes Leuchten), was auf ein hohes Ausmaß an Aktivität des β -Actin-Promotors (β -Actin ist eines der Hauptproteine des Cytoskeletts) in ES-Zellen hinweist. Die Kolonien wurden durch Ansaugen mit einer Paster-Pipette aufgenommen, einzeln trypsinisiert und anschließend für die Vermehrung auf 48- und 24-Napf-Platten mit Feederschichten mit G418 (300 μ g/ml) übertragen. Schließlich wurden mehrere stabile ES-Klone, die 1 bis 5 Kopien des GFP-Gens unter der Kontrolle des Huhn- β -Actin-Promotors trugen, ermittelt und zur Erzeugung embryonaler Körper (EBs) verwendet.

c) Differenzierung und Analyse der Kardiomyozyten: EBs wurden nach dem Standardverfahren der "hängenden Tropfen" entwickelt (A. Wobus, G. Wallukat und J. Hescheler: Differentiation (1991) 48, 173-182).

In allen Stadien der Entwicklung vor dem Ausschneiden zeigten die EBs, die von ES-Zellen mit integriertem GFP-Expressionsvektor unter der Kontrolle des β -Actin-Promotors abstammten, unter dem Fluoreszenzmikroskop ein starkes grünes Leuchten. Nach dem Ausschneiden verteilt sich die GFP-Expression in ungleichen Anteilen zwischen verschiedenen Zelltypen, die im Laufe der Differenzierung auftreten. Das hellste grüne Leuchten in EBs nach dem Auftreten kontraktiler Myocardiocyten fällt mit entsprechenden schlagenden Bereichen und nicht mit schlagenden Kernbezirken (zentralen Teilen) von EBs zusammen.

55 Andere Bereiche der EBs zeigen verschiedene Ausmaße der GFP-Expression von stark bis schwach, was auf die bekannte weit verbreite Expression von β -Actin als Hauptkomponente des Cytoskeletts bei vielfältigen Zelltypen hinweist.

60 Diese visuellen Beobachtungen werden durch Histogramme der Verteilung der GFP-Expression in den Zellpopulationen in den sich entwickelnden EBs bestätigt, die man durch FACS-Analyse (Flow Cytometry) erhält. Sie zeigen die Linksverschiebung und Vergrößerung anfangs scharfer, symmetrischer Peaks des Histogramms, was einen Übergang von hoher und relativ homogener GFP-Expression 65 in einer Population proliferierender undifferenzierter ES-Zellen zu einer breiten Verteilung derselben auf die Population sich differenzierender Zelltypen anzeigen.

EBs wurden mittels Kollagenase dissoziiert und auf Objekträgern ausgestrichen und anschließend 2-3 Tage lang kultiviert, bevor elektrophysiologische Messungen nach dem Standardverfahren vorgenommen wurden (V. Maltsev, A. Wobus, J. Rohweder, M. Bader und J. Hescheler; Circ. Res. (1994) 75 (2), 233-244).

Isolierte, spontan schlagende Kardiomyozyten, die GFP stark exprimieren, weisen alle elektrophysiologischen Eigenschaften auf, die für Kardiomyozyten typisch sind einschließlich Aktionspotentialen, Ca^{2+} -, Na^+ -, K^+ - und I^- -Strömen, was durch die Patch-Clamp-Technik gezeigt wurde.

Stabile ES-Zelllinien, die aufgrund eines in das Genom integrierten Expressionsvektors GFP stark exprimieren, können sich also zu funktionell reifen kontraktilem Kardiomyozyten differenzieren, die dieselben elektrophysiologischen Grund-eigenschaften haben wie Kardiomyozyten, die sich aus "normalen" D3-Zellen differenzieren: haben.

Beispiel 2

Herstellung stabiler ES-Zelllinien, die GFP unter einem herzspezifischen Promotor in sich differenzierenden Kardiomyozyten exprimieren.

a) Herstellen des GFP-Expressions-Konstrukt: Aus dem von Dr. M. McBurney (University of Ottawa, Kanada) zur Verfügung gestelltem Plasmid pPv/B-ActIacZ, das das Segment (-440+6) des herzspezifischen Human- α -Actin-Promotors enthielt (A. Minty, L. Kedes; Molecular and Cellular Biology (1986) 6, 2125-2136; G. Pari, K. Jardine und M. McBurney; Molecular and Cellular Biology (1991) 11, 4796-4803), wurde der Promotor durch die Restriktionsenzyme Sall und HindIII herausgeschnitten. Der pCX-GFP-Expressionsvektor (siehe Beispiel 1) wurde – um den Huhn- β -Actin-Promotor durch den herzspezifischen α -Actin-Promotor zu ersetzen – mit den Restriktionsenzymen SnaBI und ApaI gespalten, wobei der Huhn- β -Actin-Promotor herausgeschnitten wurde. Nachfolgend wurde durch Ligasierung mit glatten Enden das oben genannte Sall-HindIII-Fragment des herzspezifischen α -Actin-Promotors eingefügt. Die Restriktionsenzyme Tth11I, Sall und HinfI wurden verwendet, um Plasmidklone zu selektieren, bei denen der herzspezifische α -Actin-Promotor in der richtigen Orientierung zur GFP-codierenden Sequenz eingesetzt war. Dann wurde ein Neomycin-(G418)-Resistenz-Gen, wie in Beispiel 1a) beschrieben, in die Sall-Stelle eingesetzt, und das resultierende Plasmid pCX-(α -act)GFP-Neo (Fig. 2) wurde für die Elektroporation von D3-Zellen verwendet.

b) Elektroporation und Selektionsverfahren: Das pCX-(α -act)GFP-Neo wurde mit ScaI (außerhalb der GFP-Expressionscassette, wie in Beispiel 1b) beschrieben) oder mit AaI linearisiert, um den Cytomegalovirus-(GMV-IE)-Enhancer zu zerstören (siehe unten). Die Elektroporation und das G418-Selektionsverfahren wurden, wie in Beispiel 1b) beschrieben, durchgeführt.

c) Analyse der Zellpopulation und GFP-Expression unter der Kontrolle des herzspezifischen α -Actin-Promotors während der Differenzierung von Kardiomyozyten: EBs wurden, wie in Beispiel 1c) beschrieben, entwickelt. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Mustern der GFP-Expression unter der Kontrolle des β -Actin-Promotors weisen ES-Zellen, die das in das Genom integrierte pCX-(α -act)GFP-Neo tragen, kein oder nur ein sehr schwaches durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbares Signal auf. Die FACS-Analyse zeigt,

dass das mittlere Niveau der grünen Fluoreszenz von D3-Zellen mit durch ScaI linearisiertem pCX-(α -act)GFP-Neo etwa 35- bis 40mal geringer ist als bei Zelllinien, die pCX-(β -act)GFP-Neo tragen. Während der Entwicklung der EBs würde eine Rechtsverschiebung und Vergrößerung des Anfangspeak des durch FACS erhaltenen GFP-Fluoreszenz-Histogramms erhalten. Die schlagenden Bereiche, die 2 bis 4 Tage nach dem Ausschneiden der EBs auftreten, zeigen ein durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbares grünes Leuchten, das mit dem Niveau der GFP-Expression in ES-Zellen, die pCX-(β -act)GFP-Neo tragen, vergleichbar ist. Möglicherweise sind die schlagenden Bereiche, die aus funktionell reifen Kardiomyozyten bestehen, nur Bereiche mit starkem sichtbarem Leuchten unter anderen Zelltypen in sich entwickelnden EBs. Bei täglicher Überwachung ist es möglich, 1 bis 1.5 Tage, bevor sie zu schlagen beginnen, getrennte leuchtende Bereiche nachzuweisen.

Der herzspezifische Charakter der GFP-Expression wurde durch α -Actin-spezifisches Immun-Anfärben einzelner Zellen bestätigt, das mit der GFP-Expression unter der Kontrolle des herzspezifischen α -Actin-Promotors korreliert.

d) Herstellung von ES-Zelllinien mit geringem 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 930

schem Promotor als "lebendes" Repoter-Gensystem verwendet wird, der Zellen in den früheren Schritten der Entwicklung sichtbar macht.

Das vorstehend beschriebene Plasmid pCX-(α -act)GFP-Neo wurden am 27.06.97 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Bezeichnung DSM 11633 hinterlegt.

Patientansprüche

10

1. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt, umfassend
 - eine für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein codierende DNA-Sequenz und
 - einen mit dieser DNA-Sequenz operativ verknüpften, zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotor
 stabil transfiziert sind. 20
2. ES-Zellen gemäß Anspruch 1, wobei die ES-Zellen von Nagern, insbesondere von Mäusen, stammen.
3. ES-Zellen gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das nicht-zellschädigende fluoreszierende Protein ausgewählt ist aus Green Fluorescent Protein (GFP), Red Fluorescent Protein und Blue Fluorescent Protein und insbesondere GFP ist. 25
4. ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor ein für Herzzellen, neuronale Zellen, Gliazellen, hämatopoietische Zellen, Endothelialzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen, Fibroblasten oder Epithelzellen spezifischer Promotor ist, insbesondere ein für Herzzellen spezifischer Promotor ist. 30
5. ES-Zellen gemäß Anspruch 5, wobei der Promotor ausgewählt ist aus den Promotoren Nkx-2.5, Human- α -Actin und MLC-2V und insbesondere der herzspezifische Human- α -Actin Promotor ist. 35
6. ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das DNA-Konstrukt weitere funktionelle DNA-Sequenzen, insbesondere Enhancer- und Selektionssequenzen, aufweist.
7. Verfahren zur Herstellung der ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend
 - Einbringen eines wie in Anspruch 1 und 3 bis 6 definierten DNA-Konstrukt in Ausgangs-ES-Zellen nicht-menschlicher Säuger und
 - Screenen nach stabil transfizierten ES-Zellen.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Einbringen durch Elektroporation erfolgt. 50
9. DNA-Konstrukt gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 und 3 bis 6.
10. DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es Plasmid pCX-(α -act)GFP-Neo (DSM 11633) ist. 55
11. Zellkultur mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden Proteins erhältlich durch Kultivieren der ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6 in vitro.
12. Zellkultur gemäß Anspruch 11, wobei die Zellen als Aggregate vorliegen. 60
13. Verfahren zur toxikologischen Prüfung von Substanzen, umfassend die Untersuchung der Auswirkungen dieser Substanzen auf Zellkulturen gemäß Ansprüchen 11 oder 12 mittels fluorimetrischer Verfahren. 65
14. Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-menschlicher Säuger mit zelltypspezifischer Expression eines nicht-zellschädigenden fluoreszierenden

Proteins, umfassend

- Injizieren von ES-Zellen gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6 in Blastozysten von nicht-menschlichen Säugern und
- Übertragen der Blastozysten in Leihmütter.

15. Transgene nicht-menschliche Säuger erhältlich durch das Verfahren gemäß Anspruch 14.
16. Verfahren zur Untersuchung von Entwicklungsstufen von Zellen nichtmenschlicher Säuger, umfassend die Untersuchung der entsprechenden gekennzeichneten Zellen von nicht-menschlichen Säugern gemäß Anspruch 15 durch fluorimetrische Verfahren in vitro.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

FIG. 1

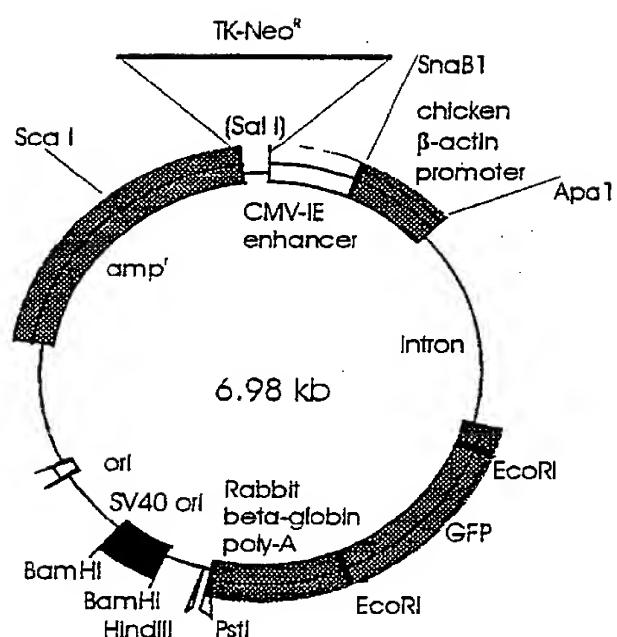
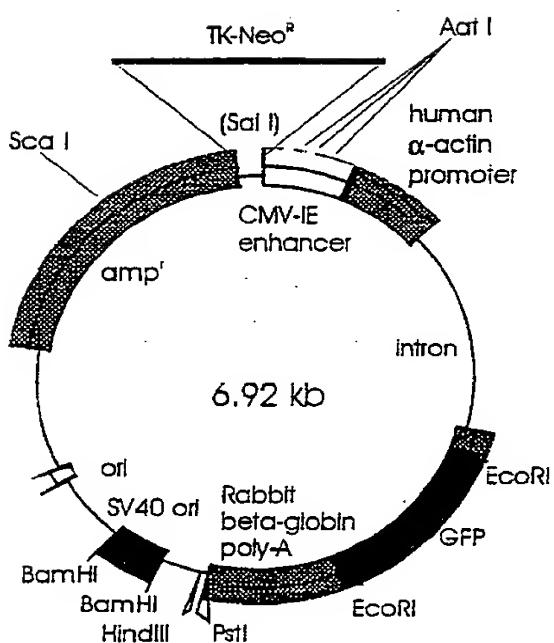


FIG. 2



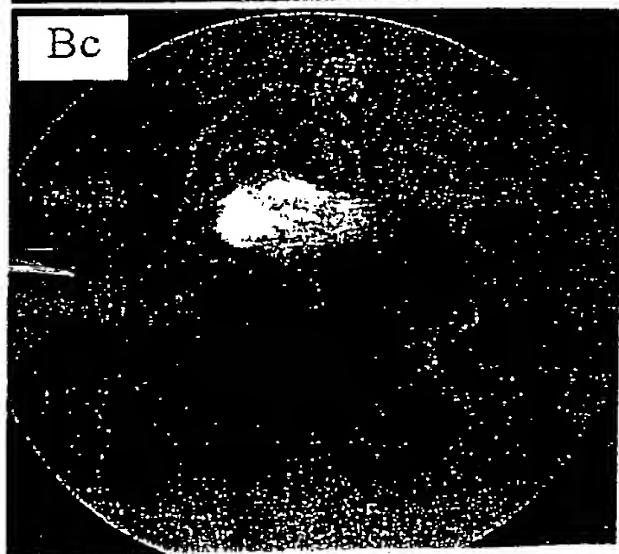
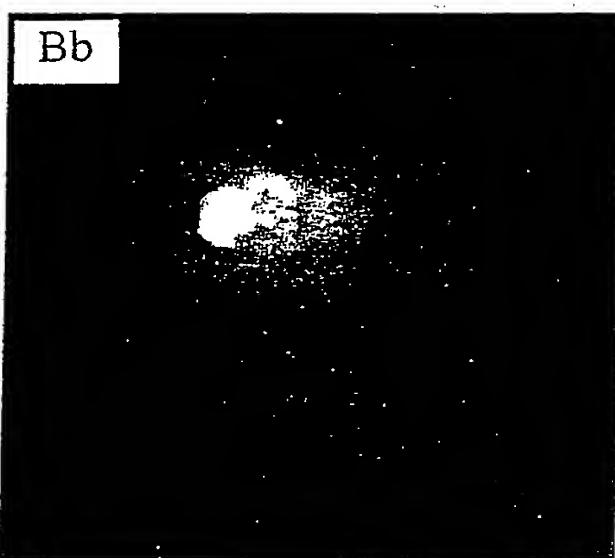
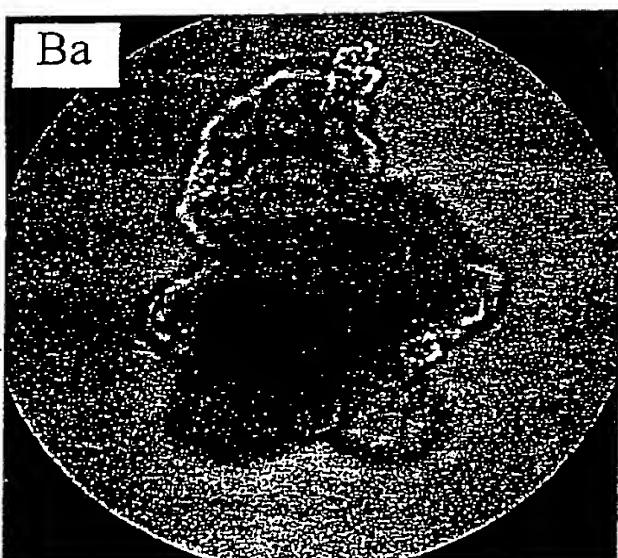
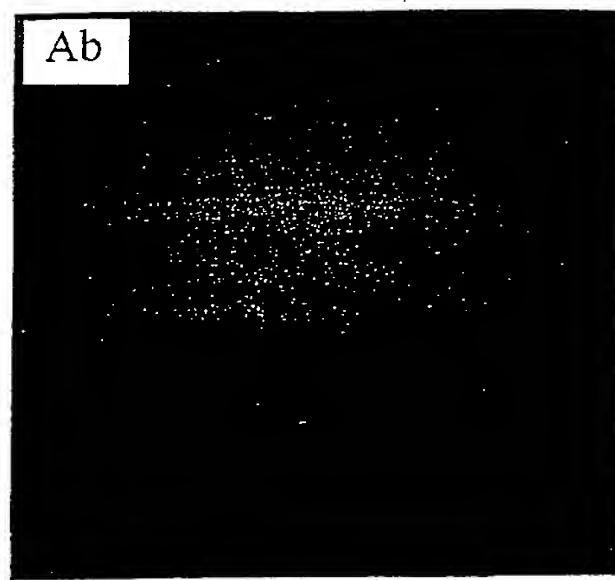
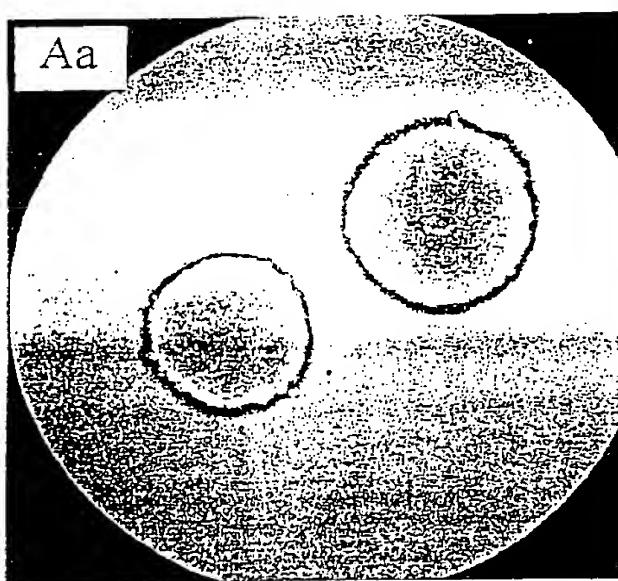
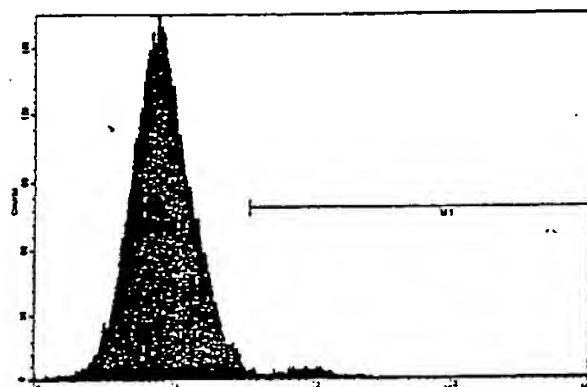
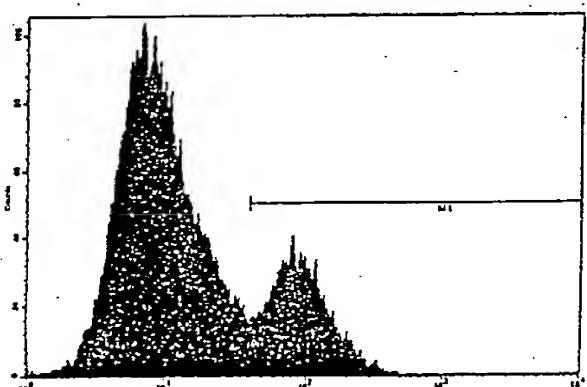


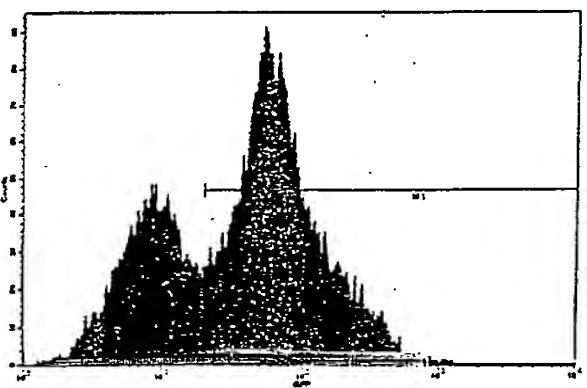
FIG. 4



a



b



c

FIG. 1

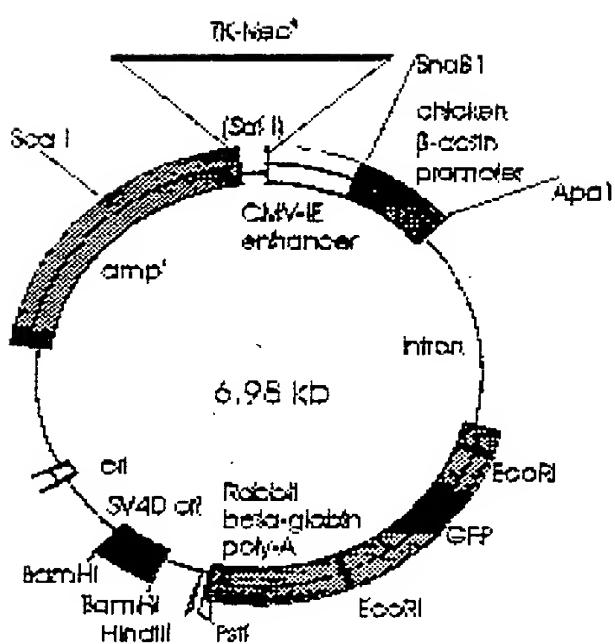
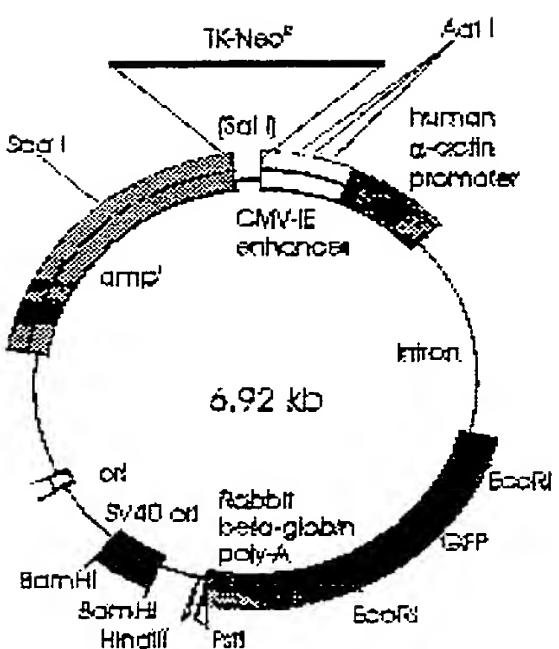


FIG. 2



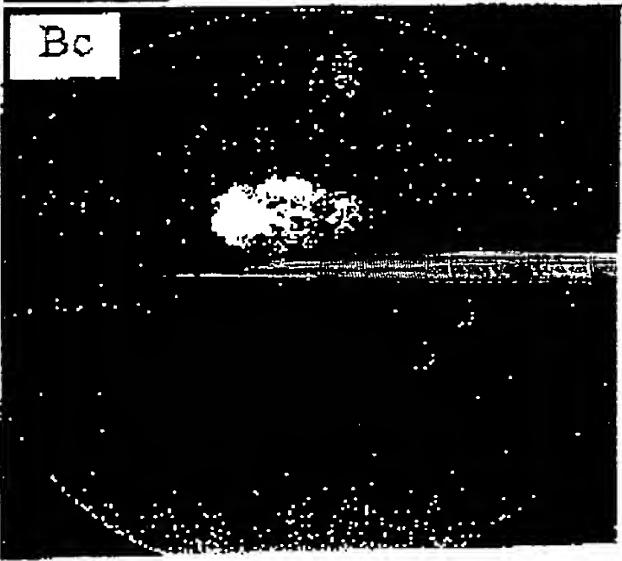
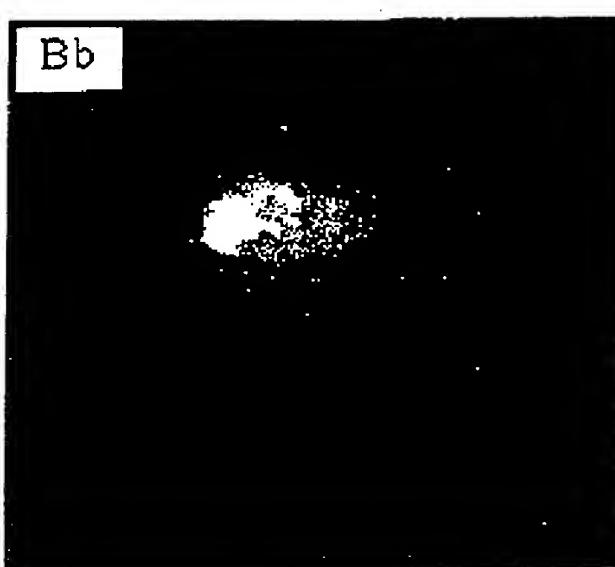
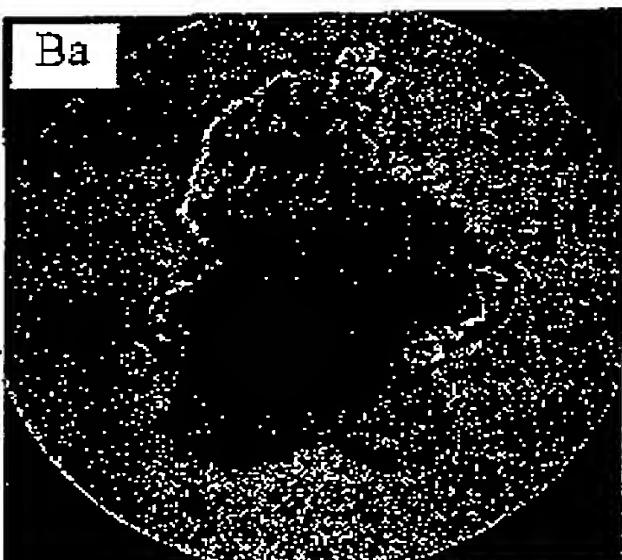
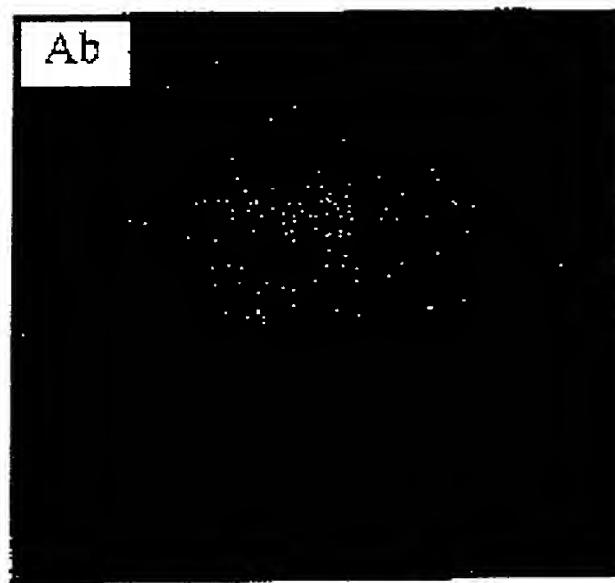
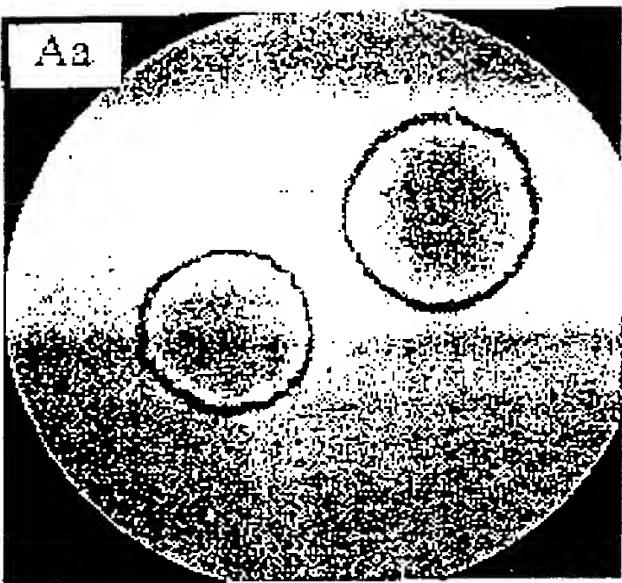


FIG. 4

